ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 52, 6, 2018

УДК 576.895 DOI: 10.1134/S0031184718060017

ВЛИЯНИЕ ЗАКИСЛЕНИЯ МОРСКОЙ ВОДЫ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И ИНВАЗИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ЦЕРКАРИЙ *HIMASTHLA ELONGATA* — ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

© В. В. Прокофьев,[1] К. Е. Николаев,[2] И. А. Левакин,[2]
Д. А. Егоров,[1] К. В. Галактионов[2, 3]

[1] Псковский государственный педагогический университет
пл. Ленина, 2, Псков, 2180760
[2] Зоологический институт РАН
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034
[3] Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская наб., 7/9, С.-Петербург, 199034
* E-mail: kirill.galaktionov@zin.ru; kirill.galaktionov@gmail.com
Поступила 03.06.2018

Исследование выполнено на церкариях трематод *Himasthla elongata*, трансмиссия которых проходит в прибрежных экосистемах Белого моря. В специально сконструированной установке тестировали влияние пониженной кислотности морской воды на продолжительность жизни церкарий и их способность заражать потенциальных промежуточных хозяев — мидий *Mytilus edulis*. Показано снижение обоих тестируемых параметров в опытах по сравнению с контролем. Обсуждается возможный эффект прогнозируемого закисления вод морей Арктики на трансмиссию трематод прибрежного комплекса.

Ключевые слова: трематоды, церкарии, продолжительность жизни, кислотность морской воды, инвазионная способность, моря Арктики, глобальные изменения климата.

В последние годы наблюдается отчетливый тренд к снижению pH и изменению карбонатной системы вод Мирового океана вследствие растворения в морской воде избыточного количества CO_2 (гиперкапния) (Gattuso, Buddemeier, 2000; Doney et al., 2009; Feely et al., 2009; Kroeker et al., 2010). Это негативно сказывается на гидробионтах и в настоящее время это явление интенсивно изучается (см. обзоры: Godbold, Calosi, 2013; Kroeker et al., 2013). Исследование влияния снижения pH на свободноживущих личинок гельминтов и на паразитирующих в морских животных стадиях их жизненных циклов еще только начинаются (MacLeod, Poulin, 2012). Имеющиеся на сегодняшний день работы ограничены несколькими видами трематод, трансмиссия которых осуществляется в прибрежных водах Новой Зеландии. Показано, что при понижении pH (ΔpИ = –0.5— –0.7) существенно снижается выживаемость церкарий и метацеркарий (адолескарий), инцистирующихся на поверхности подводного субстрата, хотя проявление этого эффекта видоспецифично (Harland et al., 2015; MacLeod, Poulin, 2015).

В соответствии с климатическими сценариями наибольшие изменения pH ожидаются для поверхностных арктических вод, где рост концентрации H^+ к концу XXI в. прогнозируется до 185 % (ΔpИ = – 0.45— –0.5) (Feely et al., 2009; Steinacher et al., 2009). Это побудило нас начать исследование по влиянию снижения pH морской воды на разные стороны жизнедеятельности церкарий и метацеркарий трематод, трансмиссия которых осуществляется в морях бассейна Северного Ледовитого океана. В настоящей статье представлены первые результаты экспериментов, выполненных на личинках широко распространенного в прибрежье северных морей вида *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831) Dietz, 1909 (Himastlidae, Echinostomatoidea). Первым промежуточным хозяином этого вида служат литоральные моллюски *Littorina littorea* (Linnaeus), роль второго промежуточного хозяина на Белом море, где проводились наши эксперименты, играют мидии *Mytilus edulis* (Linnaeus), а окончательного — чайки разных видов (Loos-Frank, 1967; Werding, 1969; Levakin et al., 2013).

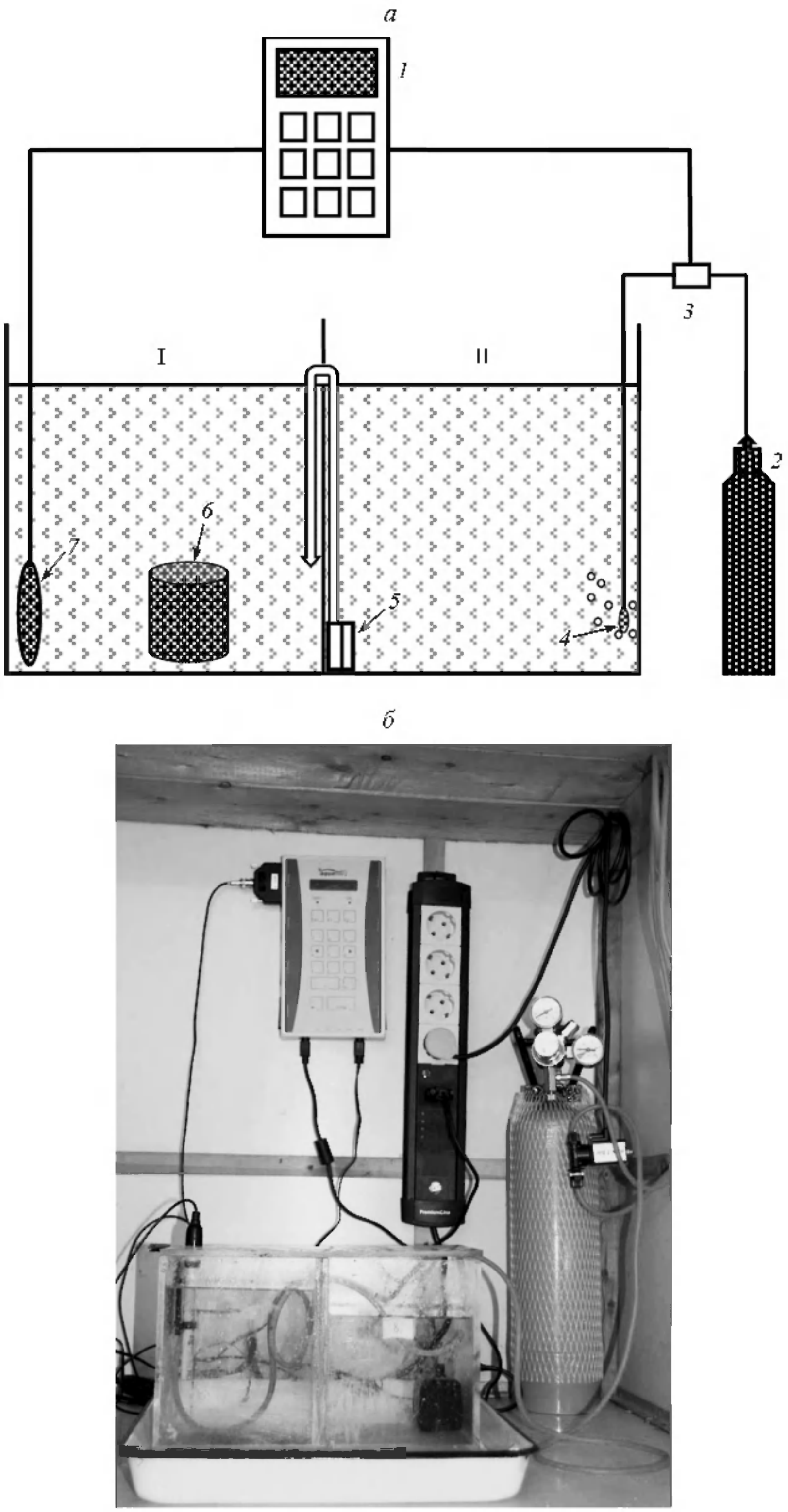
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для изучения влияния закисления (ацидификации) морской воды на разные стороны биологии церкарий трематод в термостатированной комнате на Беломорской биологической станции (ББС) Зоологического института РАН («Картеш») летом 2017 г. была смонтирована соответствующая установка (рис. 1, *а*). За основу при ее конструировании взяты схемы такого рода установок, использующихся для изучения влияния закисления морской воды на гидробионтов (Schiffer et al., 2014; MacLeod et al., 2015; Zittier et al., 2015). Использованы: сертифицированный аквариумный компьютер, датчик pH и системы подачи CO_2 (iks ComputerSysteme GmbH). Установка представляет собой аквариум объемом 10 л, разделенный на два равных бокса (рис. 1, *а*): бокс I — рабочий, и бокс II — вспомогательный, служащий в качестве ресивера для плавного изменения pH в рабочем боксе. В боксе I располагали pH-электрод и сосуд с исследуемыми животными. pH-электрод подключали к управляющему компьютеру. В боксе II размещали микропомпу, перекачивающую воду из бокса I в бокс II. Из бокса I вода самотеком перетекала в бокс II. Таким образом, вода в боксах постоянно перемешивалась. В бокс II помещали трубку-распылитель CO_2, соединенную с соленоидным клапаном. К последнему при-

Рис. 1. Установка для изучения влияния изменения pH воды на жизнедеятельность церкарий.

а — схема установки: I, II — соединяющиеся друг с другом части аквариума; *1* — управляющий компьютер, *2* — баллон с CO_2, *3* — соленоидный клапан, *4* — распылитель CO_2, *5* — насос, *6* — сосуд с экспериментальными животными, *7* — pH-электрод. *б* — установка, смонтированная в термостатированной комнате на ББС.

The experimental setup for investigation of the impact of seawater acidification on cercarial life activity. The setup schematic (*a*) and the setup mounted in the thermostatic room (*б*).


а
I
II
б

соединяли трубку от баллона с CO_2. Таким образом, углекислый газ поступал в бокс II через соленоидный клапан. Клапан подключали к управляющему компьютеру, который мог открывать или закрывать клапан, регулируя тем самым подачу CO_2 в установку. При проведении экспериментов в компьютере устанавливали необходимое значение pH. В процессе работы компьютер непрерывно сравнивал значения pH, полученные от pH-электрода, с заданными и в случае повышения pH открывал соленоидный клапан. Это приводило к поступлению CO_2 в установку и снижению pH до установленного значения, после чего компьютер отключал клапан, что прекращало подачу CO_2 в установку. Таким образом, уровень pH поддерживался на заданном уровне все время наблюдений.

Моллюски *L. littorea* собраны в литоральной лагуне на мысе Красный (губа Чупа, Кандалакшский залив Белого моря) в июле 2017 г. Выявление зараженных группировками редий *H. elongata* особей проводили по методике, описанной ранее (Прокофьев и др., 2017). Отобранных моллюсков, инвазированных *H. elongata*, отсаживали в отдельный сосуд и использовали в дальнейшей работе.

Эксперименты проведены в июле—августе 2017 г. при стабильной температуре (T) и освещенности (E): T = 20 °C и E = 26 Лк (12 Fc). Для получения церкарий, зараженных редиями *H. elongata*, литорин помещали на 1 ч в отдельные емкости (100 мл), заполненные морской водой. Выделившихся личинок сразу же использовали в эксперименте. Для опытов с каждым из тестируемых значений pH воды церкарий рассаживали в 20 пластиковых сосудов емкостью 30 мл по 30—50 экз. в каждый. Горло сосудов затягивали мелким газом так, что церкарии не могли выплыть наружу, но в сосуд могла свободно поступать вода из аквариума. Сосуды с церкариями помещали в рабочий бокс (бокс I) аквариума, в котором задавалось тестируемое значение pH. Всего поставлено 5 экспериментов при следующих градациях pH: 7.75; 7.25; 6.75; 6.5 и 6.25 (естественная pH морской воды на литорали в районе ББС в период проведения экспериментов составляла 7.75—7.8). Каждый опыт продолжался вплоть до гибели всех церкарий в каждом экспериментальном сосуде. Каждые 2 ч емкости с церкариями извлекали из аквариума, подсчитывали число погибших (погибшими считали осевших на дно сосуда и не проявлявших двигательной активности личинок) особей и удаляли их. После этого емкости с живыми церкариями возвращали в аквариум.

Для оценки влияния ацидификации морской воды на инвазионную способность церкарий *H. elongata* в качестве второго промежуточного хозяина использовали стерильных по отношению к заражению метацеркариями мидий *Mytilus edulis* размера 18—20 мм, собранных с субстратов марикультуры. Заражение мидий церкариями проводили при четырех значениях pH = 7.8 (контроль), 7.5, 7.0 и 6.5. Перед заражением моллюсков акклимировали к экспериментальным значениям pH в течение 2 сут. Для церкарий акклимацию проводили на протяжении 1 ч. Акклимированных мидий поодиночке рассаживали в пластиковые сосуды емкостью 150 мл с морской водой тестируемой pH и добавляли к ним по 20 акклимированных церкарий. После этого горло сосудов затягивали мелким газом и помещали в рабочий бокс аквариума (бокс I) на 1 сут. Затем мидий вскрывали и подсчитывали число инцистированных метацеркарий *H. elongata*.

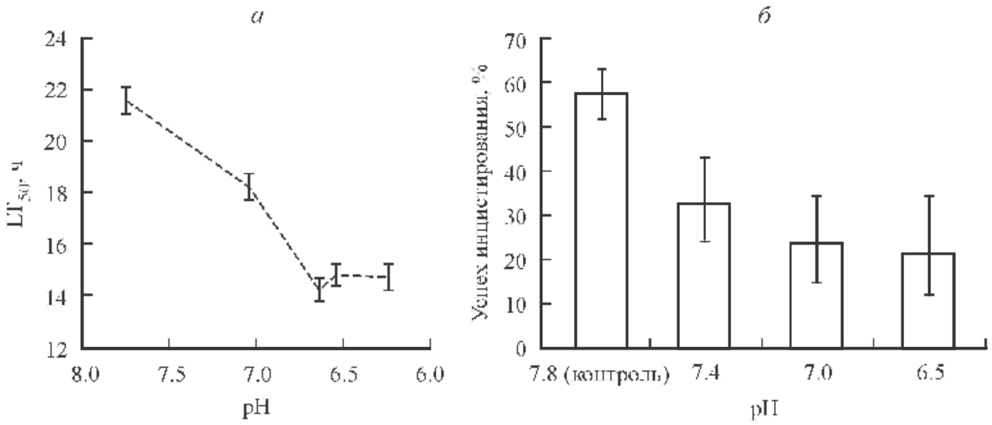


Рис. 2. Влияние ацидификации морской воды на церкарий *Himasthla elongata*.

а — продолжительность жизни (LT_{50}, ч) при разных значениях pH; *б* — инвазионная способность, выраженная в %, успешно инцистировавшихся в мидиях личинок, при разных значениях pH.

The impact of seawater acidification on the life span (LT_{50}) (*а*) and infectivity (*б*) of *Himasthla elongata* cercariae.

В эксперименте с каждым тестируемым значением pH участвовало по 5 мидий.

Продолжительность жизни церкарий определяли как показатель LT_{50} (время полужизни церкарий) отдельно для каждой пробы (20 проб на одну градацию кислотности) линейной интерполяцией временно́го интервала, в течение которого погибало 50 % личинок. Для оценки значимости влияния кислотности воды на показатель LT_{50} церкарий *H. elongata* использовали однофакторный дисперсионный анализ. Силу влияния фактора «pH» (η^2) определяли по Плохинскому. Достоверность межгрупповых различий (Post-Hoc) оценивали по критерию Тюки. За меру инвазионной способности церкарий приняли долю успешно инцистировавшихся в тканях мидий личинок. Достоверность различий оценивали по критерию χ^2-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Повышение кислотности среды примерно в 1.5 раза ($P_F < 0.01$; $\eta^2 = 86.6\,\%$; $P_{\eta^2} < 0.01$) сокращало время жизни церкарий *H. elongata* (рис. 2, *а*). Показатель LT_{50} достоверно ($P < 0.01$, тест Тюки) понижался при снижении pH с 7.75 (естественная кислотность: $LT_{50} = 21.5 \pm 0.6$ ч) до 7.05 ($LT_{50} = 18.2 \pm 0$ .6 ч) и при дальнейшем снижении pH до 6.65 (рис. 2, *а*). В диапазоне pH 6.65—6.25 продолжительность жизни личинок достоверно не различалась (рис. 2, *а*) и составляла в среднем 14.5 ± 0.3 ч.

Повышение кислотности среды приводило также к снижению ($P_{\chi^2} < 0.01$) успеха инцистирования по сравнению со значением, зарегистрированным в контроле при естественной кислотности воды (pH = 7.8) (рис. 2, *б*). В диапазоне pH 7.4—6.5 наблюдалась недостоверная ($P < 0.15$) тенденция к снижению успеха инцистирования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что даже небольшое снижение pH морской воды существенно сказывается на жизнедеятельности личинок тестированного вида *H. elongata*. Понижение pH на 0.5 от естественного для Белого моря значения этого параметра привело к статистически значимому понижению времени полужизни личинок на 3.3 ч (рис. 2, *а*). Сходные результаты получены ранее и на церкариях *Maritrema novaezealandensi*, *Galactosomum* sp., *Philophthalmus* sp. и *Parorchis* sp., использующих в качестве первых промежуточных хозяев литоральных моллюсков в прибрежье Новой Зеландии (Harland et al., 2015; MacLeod, Poulin, 2015).

В экспериментах этих авторов использовались 3 градации pH с шагом в 0.5 и при той же T = 20 °C, что и в наших опытах. Однако за начальное значение кислотности воды в опытах новозеландских коллег была принята pH = 8.1, что соответствует современной средней океанической кислотности, характерной и для прибрежных вод Новой Зеландии. В Белом море в связи с закисленностью вод его водосбора (Филатов, Тержевик, 2007) pH ниже средней океанической. В районе проведения наших исследований в июле—августе 2017 г. его значения составили 7.75—7.8. Эти параметры и были приняты за исходные в наших опытах. Это на 0.35 ниже pH вод прибрежья Новой Зеландии. Циркулирующие в прибрежных экосистемах Белого моря трематоды, по-видимому, акклиматизировались к такому пониженному по сравнению со среднеокеаническим значению pH. Во всяком случае суточная продукция церкарий из зараженных партенитами трематод беломорских гастропод значимо не отличается от известных по литературе значений этого показателя для других морей умеренных широт (Prokofiev et al., 2016). Значения ΔpH = – 0.35 и ΔpH = = – 0.5, при которых и в наших опытах, и в опытах с новозеландскими церкариями (Harland et al., 2015; MacLeod, Poulin, 2015) наблюдалось значимое снижение LT_{50} личинок, несильно различаются. Можно предположить, что определенное понижение этого показателя произойдет и при помещении новозеландских церкарий в воду с нормальным для Белого моря значением pH = 7.75. Приведенные материалы, на наш взгляд, указывают на высокий акклиматизационный потенциал трансмиссивных личинок трематод.

Отсутствие значимых различий в LT_{50} церкарий *H. elongata* в диапазоне 6.75—6.25 пока что трудно объяснить. Для прояснения этого вопроса требуются дальнейшие эксперименты в более широком диапазоне значений pH и с более дробным шагом этих значений в опытах.

Успех заражения церкариями мидий *H. elongata* в наших экспериментах значимо снизился в условиях повышенной кислотности. Это расходится с данными Харланда и др. (Harland et al., 2015), согласно которым успех заражения амфипод церкариями *Maritrema novaezealandense* не снижался при повышении кислотности морской воды. Значение этого параметра, наоборот, было выше при наиболее низком из тестированных значений pH (7.4), что, по мнению авторов (Harland et al., 2015), обусловлено негативным воздействием столь закисленной воды на устойчивость амфипод к заражению паразитами. По-видимому, мидии не так чувствительны к воздействию повышенной кислотности воды и понижение успеха их заражения церкариями связано с негативным воздействием этого фактора на инвазионную способность церкарий. Таким образом, понижение pH воды, оказывающее, несомненно, негативное воздействие на жизнедеятельность церкарий, может по-разному влиять на успешность инвазирования ими гидробионтов-хозяев. В некоторых случаях этот негативный эффект может нивелироваться за счет ослабления защитных механизмов в широком понимании потенциальных промежуточных хозяев под влиянием низких значений pH среды.

Приведенные выше материалы наглядно свидетельствуют, что рассматривать влияние на трансмиссию трематод прогнозируемого повышения кислотности воды в арктических морях следует в комплексе с другими факторами. Эффект может быть различен для разных систем паразит—хозяин. Следует также учитывать и то, что снижение pH будет проходить не одномоментно, а постепенно на протяжении ряда лет (Kroeker et al., 2013; Stocker et al., 2013). Принимая в расчет отмеченный выше потенциал свободноживущих стадий трематод к акклиматизации, можно предположить, что паразиты смогут акклиматизироваться к новым условиям. Однако прогнозируемое к концу XXI в. снижение pH воды в арктических морях на 0.45—0.5 приводится усреднено для всей акватории. В прибрежных районах, где велико влияние речного стока, а водообмен с открытыми акваториями затруднен (в лагунах, ковшевых губах и т. п.), повышение кислотности воды может быть выражено сильнее и соответственно бо́льшим окажется влияние этого фактора на жизнедеятельность гидробионтов, включая трансмиссивные стадии трематод. Поэтому исследования воздействия разных значений pH воды на жизнедеятельность церкарий и мирацидиев трематод, чему ранее внимания практически не уделялось, выяснению оптимальных и толерантных диапазонов влияния этого фактора, акклиматизационных способностей свободноживущих личинок следует расширять. В настоящее время, оперируя сведениями по церкариям 5 видов трематод, делать далеко идущие выводы преждевременно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке темы государственных заданий АААА-А17-117030310322-3 и гранта РФФИ № 16-04-00753.

Список литературы

Прокофьев В. В., Левакин И. А., Николаев К. Е., Галактионов К. В. 2017. Свет и температура — взаимодействие факторов в определении интенсивности эмиссии церкарий *Himasthla elongata* (Trematoda, Digenea, Himasthlidae). Паразитология. 51 (6): 457—465.

Филатов Н. Н., Тержевик А. Ю. 2007. Белое море и его водосбор под влиянием климатических и антропогенных факторов. Карельский научный центр РАН, Петрозаводск. 335 с.

Doney S. C., Fabry V. J., Feely R. A., Kleypas J. A. 2009. Ocean Acidification: the other CO2 problem. Annual Review of Marine Science. 1: 169—192. https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163834

Feely R. A., Doney S. C., Cooley S. R. 2009. Ocean acidification: present conditions and future changes in a high-CO_2 world. Oceanography. 22: 36—47. https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.93

Gattuso J. P., Buddemeier R. W. 2000. Ocean biogeochemistry: calcification and CO_2. Nature. 407: 311—313. https://doi.org/10.1038/35030280

Godbold J. A., Calosi P. (eds). 2013. Ocean acidification and climate change: advances in ecology and evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society. 368 (1627): Theme issue. https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0448

Harland H., MacLeod C. D., Poulin R. 2015. Non-linear effects of ocean acidification on the transmission of a marine intertidal parasite. Marine Ecology Progress Series. 536: 55—64. https://doi.org/10.3354/meps11416

Kroeker K. J., Kordas R. L., Crim R. N., Singh G. G. 2010. Meta-analysis reveals negative et variable effects of ocean acidification on marine organisms. Ecology Letters. 13: 1419—1434. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01518.x

Kroeker K. J., Kordas R. L., Crim R., Hendriks I. E., Ramajo L., Singh G. S., Duarte C. M. et al. 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. Global Change Biology. 19: 1884—1896. https://doi.org/10.1111/gcb.12179

Levakin I. A., Losev E. A., Nikolaev K. E., Galaktionov K. V. 2013. In vitro encystment of *Himasthla elongata* cercariae (Digenea, Echinostomatidae) in the hemolymph of blue mussels *Mytilus edulis* as a tool for assessing cercarial infectivity and molluscan susceptibility. Journal of Helminthology. 87: 180—188. https://doi.org/10.1017/S0022149X1200017X

Loos-Frank B. 1967. Experimentelle Untersuchung uber Bau, Entwicklung und Systematik der Himasthlinae (Trematoda, Echinostomatidae) des Nordseeraumes. Zeitschrift fur Parasitenkunde. 28: 299—351. https://doi.org/10.1007/BF00260294

MacLeod C. D. 2016. Parasitic infection: a missing piece of the ocean acidification puzzle. ICES Journal of Marine Science. 74 (4): 929—933. https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw156

MacLeod C. D., Poulin R. 2012. Host-parasite interactions: a litmus test for ocean acidification? Trends in Parasitology. 28: 365—369. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.06.007

MacLeod C. D., Poulin R. 2015. Differential tolerances to ocean acidification by parasites that share the same host. International Journal for Parasitology. 45: 485—493. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.02.007

MacLeod C. D., Doyle H. L., Currie K. I. 2015.Technical Note: Maximising accuracy and minimising cost of a potentiometrically regulated ocean acidification simulation system. Biogeosciences. 12: 713—721. https://doi.org/10.5194/bg—12—713—2015

Prokofiev V. V., Galaktionov K. V., Levakin I. A. 2016. Patterns of parasite transmission in polar seas: daily rhythms of cercarial emergence from intertidal snails. Journal of Sea Research. 113: 85—98. https://doi.org/10.1016/j.seares.2015.07.007

Schiffer M., Harms L., Poertner H. O., Mark F. C., Storch D. 2014. Pre-hatching seawater pCO_2 affects development and survival of zoea stages of Arctic spider crab *Hyas araneus*. Marine Ecology Progress Series. 501: 127—139. https://doi.org/10.3354/meps10687

Steinacher M., Joos F., Frölicher T. L., Plattner G.-K., Doney S. C. 2009. Imminent ocean acidification in the Arctic projected with the NCAR global coupled carbon cycle-climate model. Biogeosciences, 6: 515—533. https://doi.org/10.5194/bg-6-515-2009

Stocker T. F., Qin D., Plattner G.-K., Tignor M., Allen S. K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P. M. (eds). 2013. IPCC, 2013: Climate Change 2013: The Physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, 1535 p.

Werding B. 1969. Morphologie, Entwicklung und Ökologie digener Trematoden-Larven der Strandschnecke *Littorina littorea*. Marine Biology. 3: 306—333. https://doi.org/10.1007/BF00698861

Zittier Z. M. C., Bock C., Pörtner H. O. 2015. Impact of ocean acidification on thermal tolerance and acid-base regulation of *Mytilus edulis* (L.) from the North Sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 473: 16—25. http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2015.08.001

IMPACT OF SEAWATER ACIDIFICATION ON LONGEVITY AND INFECTIVITY OF TREMATODE CERCARIAE *HIMASTHLA ELONGATA*: FIRST FINDINGS

V. V. Prokofiev, K. E. Nikolaev, I. A. Levakin,
D. A. Egorov, K. V. Galaktionov

Key words: trematodes, cercariae, longevity, infectivity, acidification of sea water, global climate changes, Arctic seas.

SUMMARY

The study was carried out on cercariae of the trematode *Himasthla elongata* transmitted in the coastal ecosystems of the White Sea. Experiments on the impact of seawater acidification on the life activity of larvae were performed in a specially designed chamber at stable temperature 20°C and light intensity 12 Fc. The lifespan of cercariae was assessed with the use of LT_{50} index, that is, the time during which half of the cercariae in experimental vessels died. As the water pH decreased from 7.75 (natural pH of water in the White Sea is 7.75—7.8) down to 7.25 and further down to 6.75, a statistically significant decrease of LT_{50} values was observed. No statistically significant differences between the values of LT_{50} at water pH 6.75; 6.5 and 6.25 were found. Infectivity of cercariae was assessed with the use of the proportion of successfully encysted larvae in the tissues of the second intermediate hosts, mussels *Mytilus edulis*. At all the three experimentally tested values of the seawater pH cercarial infectivity was significantly lower than in the control group kept at pH = 7.8, which is natural for the White Sea. Our data indicate that the decrease in the seawater pH, which is forecasted for the Arctic seas by the end of the 21st century, might have an adverse effect on trematode transmission. However, this scenario does not seem likely if we take into account a high acclimation potential of cercariae. The impact of seawater acidity on the activity of free-living larvae of trematodes is extremely poorly studied, and any far-reaching conclusions would be premature. Further studies involving more species and host-parasite associations are the only way to elucidate this problem.